

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/46719 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:
B01L 7/00, A01N 1/02

G01N 1/42,

(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; v. Bezold & Sozien,
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14400

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Dezember 2001 (07.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 60 889.2 7. Dezember 2000 (07.12.2000) DE
101 44 925.9 12. September 2001 (12.09.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, 80636
München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter
[DE/DE]; Kavalierstrasse 15, 13187 Berlin (DE). HAGE-
DORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Str. 16, 13057 Berlin
(DE). ZIMMERMANN, Heiko [DE/DE]; Untere Kaiser-
str. 42, 66386 St. Ingbert (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

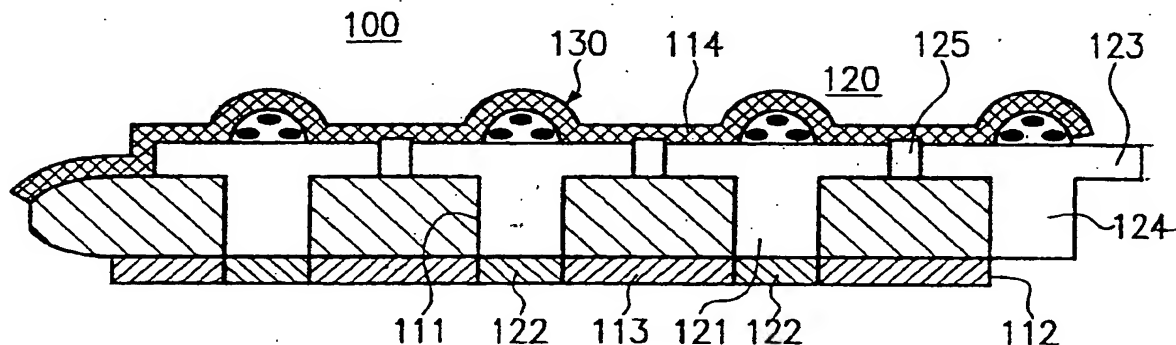
Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CRYOSTORAGE METHOD AND DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR KRYOSPEICHERUNG



(57) Abstract: The invention relates to a cryopreservation method, according to which at least one sample is placed on a storage substrate, and position-specific sample data that characterizes attributes of the sample is stored. The invention also relates to a storage substrate for use in cryopreservation involving a method of the aforementioned type.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Kryokonservierung werden auf einem Speichersubstrat mindestens eine Probe angeordnet und positionsspezifisch Probandaten, die für Merkmale der Probe charakteristisch sind, gespeichert. Es wird auch ein Speichersubstrat zur Kryokonservierung mit einem derartigen Verfahren beschrieben.

WO 02/46719 A2

BEST AVAILABLE COPY

proben ist dies kein Problem, da Organ- oder Blutbehälter mit einer Beschriftung versehen werden können. Das Auffinden der Kryoproben erfolgt in Abhängigkeit vom Ablagesystem der jeweiligen Kryobank.

Bei kleinen Kryoproben in Form von gefrorenen Suspensionstropfen, Zellen, Zellaggregaten oder Zellbestandteilen ist die Identifizierung der Kryoproben erheblich problematischer. Eine Kryoprobe wäre gegenüber der Beschriftung vernachlässigbar klein. Oft besteht ein Interesse an der Kryokonservierung einer Vielzahl mikroskopisch kleiner Proben. Die Lagerung und Identifizierung von kleinen Kryoproben mit Beschriftung wäre unpraktikabel. Des Weiteren liegen die kryokonservierten Zellproben bei herkömmlichen Konservierungstechniken, die auf dem Aufsprühen von Zellsuspensionen auf gekühlte Oberflächen (siehe z. B. EP-B 0 475 409) beruht, in einem ungeordneten Zustand vor. Es können lediglich größere Menge von Einzelproben unspezifisch gemeinsam konserviert werden.

Bei den in EP-B 0 804 073 und DE-OS 199 21 236 beschriebenen Konservierungstechniken ist eine geordnete Ablage und spezifische Bearbeitung selbst kleinster Proben auf Kryosubstraten möglich. Die Probenablage erfolgt bspw. unter Verwendung einer Mikrotropfenschusseinrichtung, die auf der Grundlage bestimmter Zielkoordinaten angesteuert wird. Die Proben befinden sich auf definierten Substratpositionen, an denen auch eine spezifische Vermessung von Probeneigenschaften und Identifizierung der Proben ermöglicht wird. Das Substrat kann mit einer Markierung versehen sein, um die Probenpositionen auf dem Substrat zu definieren. Beispielsweise wird in DE-OS 199 21 236 für die matrixartige Ablage von Kryoproben in geraden Zeilen und Spalten vorgeschlagen, das Substrat mit einer Bezeichnung

Ringbereich gebildet. Aus DE-OS 197 52 085 ist bekannt, diesen Ringbereich zu Speicherung von Probandaten auszugestalten. Der herkömmliche Probenträger besitzt den Nachteil, lediglich zur Aufnahme von flüssigen Proben und nicht für die Kryokonservierung ausgelegt zu sein. Außerdem stellt die Speicherung von Probandaten auf dem Innenring die selben Nachteile dar, wie die o. g. Substratmarkierung. Es können zwar mehr Daten gespeichert werden, die Zuordnung zu den einzelnen Proben ist jedoch nicht fehlerfrei möglich.

Neben den genannten Nachteilen der herkömmlichen Techniken gibt es des Weiteren den folgenden Grund für die bisher gering entwickelte Anwendung der Kryokonservierung insbesondere in der zellulären Biotechnologie. Wenn ein direktes Einfrieren biologischer Proben in einer flüssigen Kühlphase (z. B. Stickstoff) erfolgt, besteht ein Kontaminationsrisiko. Über die Kühlphase können Viren auf die Proben übertragen werden. Um dieses Risiko zu vermeiden, muss der Kontakt mit der flüssigen Phase vermieden oder für eine dichte Abdeckung der Proben gesorgt werden. Dies ist bisher jedoch nicht in praktikabler Weise realisiert worden.

Aus der Labortechnik sind Probenträger, z. B. in Form von Objektträgern oder Mikrotiterplatten bekannt, die mit Datenspeichern ausgestattet sind. Diese herkömmlichen Probenträger sind für eine Kryospeicherung nicht geeignet. Erstens sind sie lediglich für eine Nutzung bei Raumtemperatur oder einer Kühlschrankschranktemperatur oberhalb des Gefrierpunkts von Wasser ausgelegt. Eine Verwendung bei tieferen Temperaturen war bisher nicht vorgesehen. Zweitens sind herkömmliche Probenträger als Substrate für Proben vorgesehen. Auf den Substraten erfolgt beispielsweise eine Behandlung, Manipulierung oder Kultivierung von Proben. Für eine Lagerung oder Speicherung im konser-

die Ablage von Proben und Probendaten an gemeinsamen oder eng benachbarten oder aneinandergrenzenden Positionen des Substrates werden eine Reihe von Vorteilen erzielt. Die Probendaten sind durch ihre Ablageposition eindeutig den jeweiligen Proben zugeordnet. Eine Verwechslung der Probenzuordnung wird ausgeschlossen. Bei Entnahme von Proben können simultan am Ablageort die zugehörigen Daten abgelesen oder mit dem Speichermedium vom Substrat entfernt, so dass auch nach der Probenentnahme bei der weiteren Verarbeitung die Identifizierung der Probe und die Zuordnung der Probendaten sichergestellt ist. Es kann eine Entnahme von einzelnen Proben bei beliebigen Temperaturen, insbesondere auch im gefrorenen Zustand, erfolgen.

Ein wesentlicher Fortschritt, der mit der Erfindung erzielt wird, besteht darin, dass erstmalig eine Verfahrensweise und geeignete Vorrichtungen bereitgestellt werden, die optimal für eine Speicherung, Konservierung oder Lagerung biologischer Proben über lange Zeiträume (Monate und Jahre) bei tiefen Temperaturen (z. B. unterhalb -50°C) eingerichtet sind. Mit der Erfindung wird für die Verwendung von Datenspeichern ein neuer Anwendungsbereich bei Betriebstemperaturen erschlossen, der vor der Erfindung nicht benutzt wurde.

Anwendungsabhängig können die Probenablage und die Datenspeicherung bei Raumtemperatur mit anschließender Abkühlung zur jeweils erforderlichen Konservierungstemperatur oder auch im gekühlten Zustand erfolgen. Die Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, dass sowohl ein Schreiben als auch ein Lesen von Daten in oder aus an sich bekannten Speichermedien (z. B. optische Speicher, magnetische Speicher, elektromagnetische Speicher, FLASH-Speicher) oder in speziell für die Aufgaben der Kryospeicherung ausgelegten Speichermedien selbst bei Konservierungstemperaturen unterhalb des Gefrierpunktes des Was-

datenspeicher bilden einen festen Verbund, der zur Kryospeicherung lösbar am Speichersubstrat befestigt ist. Um eine Probe vom Speichersubstrat zu entnehmen, wird das gesamte Kryospeicherelement vom Speichersubstrat gelöst. Gegenstand der Erfindung ist auch das Kryospeicherelement an sich, das einen Probenenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einen Probandenspeicher zur Ablage zugehöriger Probanddaten umfasst. Ein Speichersubstrat wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet. Das Speichersubstrat kann anwendungsabhängig eine vorbestimmte 2- oder 3-dimensionale geometrische Form besitzen. Gemäß bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung hat der Grundkörper des Speichersubstrates die Gestalt einer optischen Speicherplatte (CD-ROM), in die die Kryospeicherelemente integriert sind, oder mindestens einer Leiterplatte, auf der die Kryospeicherelemente wie elektrische Schaltkreise (Chips) aufgesetzt sind.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Betreiben einer Kryobank mit einer Vielzahl von Speichersubstraten. Auf mindestens einem Speichersubstrat werden eine Vielzahl von Proben abgelegt, die bspw. zu einem Organismus (Probanden) gehören. Die Proben umfassen bspw. eine oder mehrere spezifische Zellen des Probanden (z. B. Stammzellen, Gewebezellen). Die Ablage der Proben erfolgt zunächst gemeinsam mit den probenspezifischen Daten, insbesondere Daten zur Identifizierung der Art der Proben und des Probanden, des Konservierungszeitpunktes und der zum Zeitpunkt der Konservierung vorliegenden Messdaten. Im Verlauf des Betriebes der Kryobank werden Proben gemeinsam mit den zugehörigen Probanddaten für Messzwecke, diagnostische Aufgaben oder therapeutische Verfahren entnommen und/oder weitere Proben oder Probanddaten ergänzt. Die Proben-

so dass die Historie einer Probe rekapituliert werden kann. Dies stellt einen besonderen Vorteil bei medizinischen Anwendungen der Erfindung dar.

Erfindungsgemäße Kryospeicherelemente werden vorzugsweise unter Verwendung tieftemperaturverträglichen Kunststoffmaterials hergestellt, das einerseits den Probenträger und andererseits eine Einbettung für den Probendatenspeicher bildet. Das Kunststoffmaterial kann ohne Veränderung und ohne Schaden wiederholte Temperaturwechsel tolerieren. Es wird vorzugsweise ein Kunststoffmaterial verwendet, dessen Wasseraufnahmefähigkeit $< 1 \%$ der Eigenmasse, insbesondere $< 0.1 \%$ der Eigenmasse beträgt. Erfindungsgemäße Kryospeicherelemente basieren beispielsweise auf Polyurethan, Polytetrafluorethylen oder Polyethylen. Erfindungsgemäße Speichersubstrate besitzen vorteilhafterweise eine hohe mechanische Stabilität und Langzeithaltbarkeit. Die erfindungsgemäße Kryospeicherung ermöglicht erstmalig eine sichere Ablage von biologischen Proben über Jahrzehnte. Eine Kryobank kann über die gesamte Lebensdauer eines Probanden, z. B. für die Dauer eines Menschenalters, zuverlässig betrieben werden. Das Speichersubstrat besitzt einen relativ einfachen Aufbau, der einen massenhaften Einsatz von Speichersubstraten in Kryobanken ermöglicht.

Die Erfindung besitzt auch Vorteile in Bezug auf das genannte Kontaminationsrisiko. Die erfindungsgemäßen Speichersubstrate ermöglichen eine Reihe von unten erläuterten Maßnahmen, mit denen verhindert wird, dass ein flüssiges Kühlmedium direkt mit den Proben in Verbindung kommt. Eine virale Kontamination über die Kühlphase wird vermieden. Es wird auch der Niederschlag von Wasser oder anderen Substanzen auf den Proben ausgeschlossen.

strates gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 2

eine schematische Illustration der Probenentnahme von einem Speichersubstrat gemäß Figur 1,

Figuren 3 bis 7

schematische Draufsichten auf verschiedenen Gestaltungen von Proben- und Speicheranordnungen auf einem Speichersubstrat,

Figur 8

eine schematische Schnittansicht eines Teils eines Speichersubstrates gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 9

schematische Ansichten verschiedener geometrischer Anordnungen von Kryospeicherelementen,

Figur 10

eine schematische Schnittansicht eines Teils eines Speichersubstrates gemäß einer dritten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 11

eine Illustration der Entnahme von Kryospeicherelementen aus einem erfindungsgemäßen Speichersubstrat gemäß einer vierten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 12

eine schematische Illustration einer folienförmigen Abdeckung an einem erfindungsgemäßen Speichersubstrat,

Speicherung von Probendaten vorgenommen, die für Merkmale der Kryoprobe charakteristisch sind. Die Speicherung der Probendaten erfolgt positionsspezifisch in einem Probendatenspeicher vorzugsweise an der Ablageposition der jeweiligen Probe. Der Verbund aus einem Probenträger zur Aufnahme einer Kryoprobe und einem Probendatenspeicher zur Ablage zugehöriger Probendaten wird als Kryospeicherelement bezeichnet. Ein erfindungsgemäßes Speichersubstrat wird vorzugsweise durch einen Grundkörper, der vorzugsweise eine flächige Gestalt besitzt, mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen gebildet.

Bei der in Figur 1 dargestellten ersten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Speichersubstrates 100 ist ein Grundkörper 110 vorgesehen, der eine Vielzahl von Kryospeicherelementen 120 trägt. Der Grundkörper 110 (ausschnittsweise dargestellt) besitzt typische Dimensionen wie z. B. eine optische lesbare/beschreibbare Speicherplatte (im Folgenden: CD, Durchmesser z. B. rund 12 cm). Zur Aufnahme der Kryospeicherelemente 120 besitzt der Grundkörper 110 Durchtrittöffnungen 111, in denen die Kryospeicherelemente in Art einer Presspassung sitzen. Auf einer Seite des Grundkörpers 110 ist ein schichtförmiges Speichermedium 112 angeordnet. Das Speichermedium 112 ist eine Datenschicht, wie sie von herkömmlichen CD's bekannt und zum Schreiben und Lesen von Daten geeignet ist. Das Speichermedium 112 ist vorzugsweise zum optischen Schreiben („Brennen“) und Lesen der Daten ausgelegt. Es kann aber auch ein magnetisches oder ein topographisches Speichermedium vorgesehen sein. Auf dem Speichermedium 112 ist ggf. eine Schutzschicht vorgesehen (nicht dargestellt).

Das Speichermedium 112 umfasst Schichtbereiche, die auf dem Grundkörper 110 aufliegen und als Basisspeicher 113 dienen, und Bereiche, die zu den Kryospeicherelementen 120 gehören und

die empfindlich gegenüber radioaktiver Strahlung oder unerwünschten Temperaturerhöhungen sind. Eine Kontrolle der Sondenproben ermöglicht eine Überprüfung des Lagerungszustandes des Speichersubstrates in einer Kryobank.

Über den Kryoproben 130 ist eine Abdeckfolie 114 angeordnet, die der Vermeidung von Kontaminationen aus dem Kühlmedium oder aus der sonstigen Umgebung dient. Typische Dimensionen der Probenaufnahmen 123 sind bspw. 0.1 bis 3 mm. Die Gesamtdicke des Speichersubstrates 100 beträgt bspw. rd. 2 mm.

Zur erfindungsgemäßen Kryospeicherung von Proben wird ein Speichersubstrat 100 (ohne die Abdeckfolie 114) zunächst mit den Kryoproben und ggf. Referenzproben beschickt. Die Beschickung erfolgt bspw. mit einer Mikrotropfenschusseinrichtung, wie es in EP-B 0 804 073 beschrieben ist. Die Proben werden als Mikrotropfen im gekühlten Zustand des Speichersubstrates 100 gezielt auf die Probenaufnahmen 123 aufgeschossen, wo sie beim Auftreffen festfrieren. Ebenfalls im tiefgeköhlten Zustand des Speichersubstrates 100 erfolgt ein Einschreiben z. B. Einbrennen) erster Probendaten in die Probendatenspeicher 122. Nach Beschickung des Substrates erfolgt die Aufbringung der Abdeckfolie 114 und die Einbringung des Speichersubstrates 100 in eine Halterung unter den jeweiligen Kühlbedingungen des verwendeten Kryokonservierungssystems.

In Figur 2 ist die Entnahme von Proben vom Speichersubstrat 100 illustriert. Erfindungsgemäß erfolgt die Probenentnahme durch Abtrennen des jeweiligen Kryospeicherelementes 120 vom Grundkörper 110. Das Abtrennen erfolgt mit einer Stanzeinrichtung 140 in Zusammenarbeit mit einer Stempelinrichtung 150. Die Stanzeinrichtung besitzt ein hohles Schneidwerkzeug 141, dessen Schneide 142 an die äußere Form der Probenaufnahme 123

ben mit den jeweiligen Kryospeicherelementen bleibt der Grundkörper 110 mit den freien Durchtrittsöffnungen 111 zurück.

Figur 4 zeigt eine abgewandelte Ausführungsform mit kreisförmigen Probenaufnahmen 123. Auf jeder Probenaufnahme 123 kann ein Tropfen mit einem Volumen von einigen mm^3 abgelegt werden. Jeder Tropfen kann bis zu 10^5 Zellen enthalten. Auf dem gesamten Speichersubstrat mit einem Durchmesser von ca. 12 cm können damit bis zu 10^8 Zellen abgelegt werden.

Figur 5 zeigt eine abgewandelte Gestaltung mit kreisförmigen Probenaufnahme 123, die im Vergleich zu Figur 4 kleinere Durchmesser besitzen (z. B. 0.01 bis 1 mm). Die Gesamtzahl der Kryospeicherelemente auf dem Speichersubstrat 100 wird dadurch erhöht. Die Variabilität bei der Probenentnahme steigt.

Die in Figur 1 illustrierten Basisspeicher 113 können auch selektiv entsprechend bestimmter Bahnen im Speichermedium angeordnet sein. Dies ist in den Figuren 6 (ringförmige Speicherbahnen) und 7 (strahlförmig ausgerichtete Speicherbahnen) illustriert. Mit den Basisspeichern 113 erfolgt eine zusätzliche Fragmentierung des Speichersubstrates.

Figur 8 illustriert ausschnittsweise eine abgewandelte Form eines Speichersubstrates 200 mit einem Grundkörper 210, der durch die Probenträger 221 der Kryospeicherelemente gebildet wird. Die Probenträger 221 besitzen auf einer Seite die Probendatenspeicher 222 und auf der entgegengesetzten Seite die Probenaufnahmen 223. Die Probenträger 221 sind Formteile, z. B. aus Kunststoff oder einem Halbleitermaterial, in denen die Probenaufnahmen 223 als Ausnehmungen gebildet sind. Die Probenträger 221 sind über Sollbruchstellen 224 miteinander verbunden. Die Probendatenspeicher 222 bilden eine auf der Unter-

nahmeschicht besteht aus einem Kunststoffmaterial, das eine geringe Haftung zum Grundkörper 310 besitzt (z. B. aus PTFE oder Kautschuk). Die geringe Haftung ist insbesondere im Tieftemperaturbereich gegeben.

Zur Abtrennung einer Probe 330 wird die Probe mit der Probenaufnahmeschicht mit einem geeigneten Werkzeug vom Grundkörper 310 abgetrennt (z. B. abgehoben, abgehobelt, abgeschoben oder abgezogen). Der Probendatenspeicher 322 verbleibt auf der Substratunterseite.

Die Proben 330 sind auch bei dieser Ausführungsform mit einer Abdeckung 314 gegen Kontaminierungen geschützt. Die Abdeckung 314 wird durch einen Deckel gebildet, der gegenüber dem Grundkörper 310 über eine Ringdichtung 315 abgedichtet ist.

In Figur 11 ist im oberen Teilbild in perspektivischer Ansicht ein Ausschnitt eines Speichersubstrates 400 gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung dargestellt. Bei diesem Speichersubstrat sind die Kryospeicherelemente 420 in Form einer Vorperforation oder einer Presspassung im Grundkörper 410 vorgesehen. Der Grundkörper 410 und die Kryospeicherelemente 420 bilden eine ebene Platte, auf deren Unterseite das Speichermedium 412 schichtförmig angeordnet ist. Das Speichermedium 412 (Datenträgerfolie) kann ebenfalls vorperforiert sein und befindet sich auf der Unterseite des Grundkörpers 410 mit der zum optischen Ein- und Auslesen von Daten erforderlichen Planarität.

Im unteren Teilbild von Figur 11 ist das Kryospeicherelement 420 vergrößert dargestellt. Auf der Oberseite des Grundkörpers 410, der hier den Probenträger 421 bildet, ist als Probenaufnahme 423 eine Ausnehmung vorgesehen. In der Probenaufnahme

Die Abdeckung 414 kann auch Daten oder Markierungen zur Identifizierung der Probe enthalten. Gemäß abgewandelten Gestaltungen kann ein aus weiteren Schichten gebildeter Aufbau der Abdeckung 414 vorgesehen sein.

Das Prinzip der mehrschichtigen Abdeckung ist auch in Figur 13 am Beispiel einer weiteren Ausführungsform der Erfindung gezeigt. Da Speichersubstrat 500 umfasst wiederum einen Grundkörper 510 mit pilzförmigen Vorsprüngen 511, auf denen die Probenträger 521 sitzen. Die Probenträger 521 sind Formteile jeweils mit einer Probenaufnahme 523 auf der Oberseite und einer Fixierausnehmung 524 auf der Unterseite. Die Fixierausnehmungen 524 und die Vorsprünge 511 wirken wie Druckknöpfe als lösbare mechanische Verbindungen zusammen. Auf der zu den Probenträgern 521 entgegengesetzten Seite befindet sich als Speichermedium 512 eine Datenträgerschicht, die die Probendatenspeicher 522 bildet, die den jeweiligen Probenträgern 521 zugeordnet sind. Die Abdeckung 514 erfolgt nach dem Doppelschichtprinzip, das in Figur 12 illustriert ist.

Zur Entnahme eines Probenträgers 521 im gefrorenen Zustand des Speichersubstrates 500 wird ein hobel- oder keilförmiges Werkzeug unter den Probenträger 521 geschoben. Mit dem Werkzeug wird die Verbindung zwischen dem jeweiligen Vorsprung 511 und der Fixierausnehmung 524 gelöst. Die Probe wird damit mit dem Probenträger 521 und Teilen der Abdeckung 514 vom Speichersubstrat 500 abgetrennt. Auch bei dieser Ausführungsform geht bei der Abtrennung die Verbindung zum Probendatenspeicher 522 verloren. Allerdings können Probendaten auch im entsprechenden Teil der Abdeckung 514 vorgesehen sein.

findung wird das Kryospeicherelement durch einen an sich bekannten integrierten Schaltkreis (z. B. Speicherbaustein) gebildet. Der Schaltkreis enthält als Probendatenspeicher 622 mindestens einen RAM-Speicher. Das Kryospeicherelement 620 kann auch einen kompletten Rechnerschaltkreis enthalten, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert. Der Probenträger 621 ist vorzugsweise in oder in Verbindung mit der Kunststoffabdeckung oder Verkapselung des integrierten Schaltkreises gebildet.

Die Probenaufnahme 623 ist z. B. gemäß Fig. 15 eine Ausnehmung in der Kunststoffabdeckung. Bei einem herkömmlichen Chip mit einer Größe von 7 · 14 mm kann die Probenaufnahme 623 eine Grundfläche von ca. 4 · 10 mm bei einer Tiefe von 1 mm besitzen. Bei diesen Maßen können im Kryospeicherelement 620 bis zu fünf Millionen Zellen untergebracht werden.

Auf dem Boden der Probenaufnahme 623 können zusätzliche Steuereinrichtungen zur Manipulierung der Probe Sensor- und/oder Anzeigeeinrichtungen 624 vorgesehen sein. Die Steuereinrichtungen umfassen ggf. Kühl- und Heizelemente, z. B. Peltier-Elemente, Widerstandsheizelemente, zur gesteuerten Abkühlung oder Erwärmung der Probe oder Materialien mit erhöhter Wärmekapazität zur Reduzierung der Wärmebelastung der Probe während eines Chiptransportes. Als Anzeigeeinrichtung kann eine Lichtquelle vorgesehen sein, die bspw. einen bestimmten Zustand des Kryospeicherelements 620 bzw. der Probe signalisiert oder die als Messlichtquelle für Messungen an der Probe 630 dient. Zusätzlich ist das Kryospeicherelement 620 mit einer Abdeckung 614 versehen, die die Probe von Kontamination, Verdunstung und Sublimation schützt. Die Abdeckung 614 ist bspw. eine Plastik- kappe, eine aufgeschweißte Folie oder ein anderes schichtför-

selung 626 aufgebaut, in der ein Speicherschaltkreis und ggf. ein Rechnerschaltkreis angeordnet sind. Die Verkapselung 626 besteht typischerweise aus einem Kunststoffmaterial.

Der Probenträger 621 ist auf der Oberseite der Verkapselung 626 befestigt oder als Teil der Verkapselung 626 gebildet. Der Probenträger 621 besteht aus einem Kunststoffrahmen 627, in den zur Probenaufnahme mindestens ein Kryobehälter 615 integriert ist. Der Kunststoffrahmen 627 ist beispielsweise ein Spritzgussteil mit einer Größe entsprechend der Oberfläche der Verkapselung 626. Die seitlichen Rahmentteile sind mit Bohrungen versehen, in denen die Kryobehälter 615 angeordnet sind.

Jeder Kryobehälter 615 bildet mindestens eine langgestreckte Probenkammer. Die mindestens eine Probenkammer besitzt eine langgestreckte Form derart, dass der Innenquerschnitt wesentlich kleiner als ihre Längsausdehnung ist. Als Probenkammern sind beispielsweise Schläuche, Hohladeln, Kapillaren oder dgl. vorgesehen. Der Innendurchmesser einer Probenkammer liegt beispielsweise im Bereich von 5 μm bis 4 mm. Die Länge kann beispielsweise im Bereich von 0.5 cm bis 10 cm gewählt sein. Der Quotient aus Querschnittsdurchmesser und Länge einer Probenkammer ist vorzugsweise kleiner als 1/10. Die Bereitstellung von mindestens einem Kryobehälter 615 in Rohr- oder Schlauchform besitzt die Vorteile einer schnellen Beschickung oder Leerung der Probenkammern, einer hohen Miniaturisierbarkeit und einer hohen Einfriergeschwindigkeit.

Bei der in Fig. 17 illustrierten Ausführungsform der Erfindung ist zunächst ein Kryobehälter 615 durch einen mäanderförmig in den Rahmen 627 eingelegten Schlauch (teilweise dargestellt) gebildet. Nach Beschickung des Kryobehälters 615 über die Schlauchenden (siehe Pfeile) können die gestrichelt einge-

Anstelle eines durchgehenden und ggf. zugeschnittenen Schlauches gemäß Fig. 17 können als Probenaufnahme 623 auch eine Vielzahl rohrförmiger Kryobehälter 615 aus einem starren Material vorgesehen sein, die quer (Fig. 17) oder parallel (Fig. 18) zur Längsausrichtung des Kryoelements 620 ausgerichtet sind. Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 18 sind beispielsweise 5 Kryobehälter 615 in die Verkapselung 626 integriert (eingeschlossen). Dies kann durch Eingießen der Kryobehälter 615 in das Verkapselungsmaterial oder ein Aufkleben erfolgen. Die Kryobehälter 615 werden durch Hohladeln oder Kapillaren gebildet.

Die Beschickung eines Kryobehälters 615 erfolgt, indem an ein Ende ein Unterdruck angelegt und über das entgegengesetzte Einlassende 617 die Kryoprobe aufgenommen wird. Anstelle der Ausübung des Unterdrucks kann auch eine Probenaufnahme unter Wirkung von Kapillarkräften im Innern des Kryobehälters 615 vorgesehen sein. Insbesondere bei der Gestaltung gemäß Fig. 18 können in die einzelnen Kryobehälter 615 gleiche oder verschiedene Kryoproben 631, 632, ... aufgenommen werden. Die Kryobehälter 615 sind vorzugsweise derart voneinander beabstandet, dass die Einlassenden 617 entsprechend dem Format einer Mikro- oder Nanotiterplatte ausgerichtet sind.

Gemäß einer alternativen, in Fig. 19 illustrierten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kryoelements 620 wird der Kryobehälter 615 des Probenträgers 622 durch einen Schlauch gebildet, dessen Durchmesser in Längsrichtung des Schlauches veränderlich ist. Es wechseln sich Abschnitte 618 mit einem geringen Durchmesser und Teilkammern 619 ab, in denen der Schlauch erheblich verbreitert ist. Der Kryobehälter 615 umfasst eine Vielzahl von Teilkammern 619, die vorteilhafterwei-

Einlassenden 617 in die Probenreservoirs 710 ragen. Die Probenreservoirs 710 sind beispielsweise Vorratsbehälter, in denen sich Proben nach der Gewinnung von einem Probanden befinden. Die Druckeinrichtung 720 umfasst einen Druckaufsatz 721, der druckdicht auf die entgegengesetzten Enden der Kryobehälter 615 aufsetzbar ist, und eine Anschlussleitung 722, über die alle Kryobehälter 615 mit einem Unterdruck beaufschlagbar sind. Die Enden der Kryobehälter 615 sind vorzugsweise zur gemeinsamen Aufnahme des Druckaufsatzes 721 eingerichtet an einem Rahmenteil angebracht. Sie können beispielsweise in der Oberfläche des Rahmens 627 münden. Unter der Wirkung des Unterdruckes werden Proben 630 in die Kryobehälter 615 gesogen.

Nach der Beschickung des Probenträgers 621 wird das Kryospeicherelement 620 von der Ladeeinrichtung getrennt. Die Einlassenden 617 werden ggf. bis zum Rahmen 627 gekürzt. Das Kryospeicherelement 620 wird auf ein Speichersubstrat 610 (siehe Fig. 14) aufgesetzt und mit diesem in eine Umgebung mit reduzierter Temperatur, z. B. ein Kryogefäß in einer Kryobank überführt.

In Fig. 22 ist eine Möglichkeit der Probenentnahme von einem Kryospeicherelement 620 mit einem mäanderförmig geführten Kryobehälter 615 illustriert. Die Teilproben 616 werden mit einer mechanischen Trenneinrichtung 400, z. B. einer Schneideinrichtung, abgetrennt. Dies kann vorteilhafterweise im Zustand reduzierter Temperatur erfolgen, so dass die übrige Probe unverändert bleibt.

In den Fig. 23 bis 26 sind Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Kryospeicherelemente 620 gezeigt, bei denen im Unterschied zu den oben beschriebenen Ausführungsformen der Probenträger 621 nicht in eine Verkapselung des Speicherschalt-

In den Figuren 25 und 26 sind verschiedene Geometrien der kanalförmigen Probenaufnahmen 623 in den Substraten 810 schematisch illustriert. Es können beispielsweise mäanderförmige oder U-förmige Kanalformen mit verschiedenen Querschnittsdimensionen vorgesehen sein, die ggf. ineinander verschachtelt angeordnet sind.

Die in den Figuren 14 bis 26 dargestellten Ausführungsformen der Erfindung besitzt eine Reihe von Vorteilen. Das Kryospeicherelement wird durch einen elektronischen Chip gebildet, der als Probendatenspeicher einen elektronisch von außen beschreibbaren und lesbaren Speicher enthält. Eine temperaturabhängige Justage eines Lese-/Schreibkopfes etwa wie bei einem CD-Speicher ist nicht erforderlich. In dem Chip befindet sich mindestens eine Probenaufnahme entsprechend für eine oder mehrere Proben. Der Chip und/oder die Aufnahmefassung können mit einer elektronischen Schaltung zur Ansteuerung zusätzlicher Funktionselemente, Sensoren und/oder Alarmsystemen ausgestattet sein. Der in Figur 14 gezeigte Aufbau kann als dreidimensionales Mehrebenen-Kryosubstrat hergestellt werden, bei dem mehrere Leiterplatten 610 mit einer Vielzahl von Kryospeicherelementen übereinander gestapelt werden.

Die chipförmigen Speicherelemente können problemlos im gefrorenen Zustand von der Leiterplatte entnommen und auf andere Leiterplatten, Messeinrichtungen oder Bearbeitungsstationen übertragen werden, ohne dass die Probendaten verloren gehen. Die Kryospeicherelemente sind von außen elektronisch adressierbar.

Zusätzlich können zur Mehrfachabsicherung die Kryospeicherelemente mit einer oder mehreren Kennungen, automatisch lesbaren

datenspeicher gegenüber den Umgebungsbedingungen bei der erfindungsgemäßen Kryokonservierung.

Es ist ferner möglich, die Grundkörper und Kryospeicherelemente eines Speichersubstrates einheitlich mit einem Farbton oder einem digitalen oder analogen Erkennungsmuster zu versehen, die jederzeit eine eindeutige Zuordnung beider Teile zulässt. Dies besitzt Vorteile für eine automatisierbare optische Kontrolle (z. B. Farb- und Codierungserfassung).

Auf dem erfindungsgemäßen Kryospeicher können erstmals Proben-
daten in Kilobyte- bis Megabytebereich gespeichert werden. Dies ist insbesondere bei der Speicherung von Messergebnissen von Vorteil.

Während der Nutzungsdauer eines Speichersubstrates können jederzeit Daten ergänzt werden (Datenakkumulation). Auf diese Weise lassen sich alle an den Proben erworbenen Daten bzw. alle ausgeführten Manipulationen, Messungen, Behandlungen oder dergleichen lückenlos probenspezifisch dokumentieren.

Es können spezifische Behandlungen der Proben insbesondere in den Chip-förmigen Speicherelementen selektiv mit einer Prozedurprogrammierung und -speicherung durchgeführt werden. Beispielsweise kann im Rahmen einer Kryokonservierung ein bestimmtes Heiz-, Kühl-, Mess-, Kontroll- und Alarm-/Anzeigeprogramm abgearbeitet und im Progammdatenspeicher dokumentiert werden. Im gefrorenen Zustand können verschiedene Kryospeicherelemente verschiedene Temperatur- oder Messprogramme durchlaufen. Es kann z. B. lokal ein Auftauen ausgelöst werden, um eine Messung an der Probe durchzuführen. Die oben genannten Heizelemente können bei allen Ausführungsformen erfindungsgemäßer Speichersubstrate für eine lokale Erwärmung

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kryokonservierung, bei dem auf einem Speichersubstrat eine Vielzahl von Proben angeordnet und positionsspezifisch Probandaten, die für Merkmale von jeweils einer Probe charakteristisch sind, gespeichert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Probandaten auf dem Speichersubstrat an, neben oder unter der zugehörigen Probe gespeichert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem als Probandaten Informationen zur Identifizierung der Proben, Informationen über Substanzmerkmale der Proben, Messergebnisse und/oder Behandlungsschritte gespeichert werden.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Probandaten im gekühlten Zustand des Speichersubstrates gelesen und/oder geschrieben werden.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem jeweils eine Probe auf einem Probenträger angeordnet und die zugehörigen Probandaten in einem Probandatenspeicher gespeichert werden, wobei jeweils ein Probenträger und ein Probandatenspeicher ein Verbundbauteil bilden, das zur Probenentnahme vom Speichersubstrat lösbar ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem eine Probe vom Substratspeicher in Verbindung mit den gespeicherten Probandaten entnommen und auf ein anderes Substrat oder zu einer Meß- oder Behandlungseinrichtung überführt wird.

14. Speichersubstrat gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, bei dem als Kryospeicherelement ein Formteil vorgesehen ist, das den Probenträger und den Probendatenspeicher umfasst.
15. Speichersubstrat gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, bei dem als Kryospeicherelement ein integrierter Schaltkreis mit einem Speicher vorgesehen ist, der mit mindestens einem Probenträger zur Aufnahme jeweils einer Probe ausgestattet ist.
16. Speichersubstrat gemäß Anspruch 15, bei dem der Probenträger in den Aufbau des integrierten Schaltkreises integriert ist.
17. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger einen Kryobehälter aufweist.
18. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger mindestens eine schlauch-, kapillar- oder kanalförmige Probenkammer aufweist.
19. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem der Probenträger als kanalförmige Probenaufnahme in einem Substrat des integrierten Schaltkreises vorgesehen ist.
20. Speichersubstrat gemäß Anspruch 16, bei dem das Kryospeicherelement einen Rechnerschaltkreis enthält, mit dem die Funktion des Kryospeicherelements verwaltet wird und über den das Kryospeicherelement nach außen kommuniziert.
21. Kryospeicherelement, das einen Probenträger für eine Probe und einen Datenspeicher zur Speicherung von Probendaten umfasst.

1/17

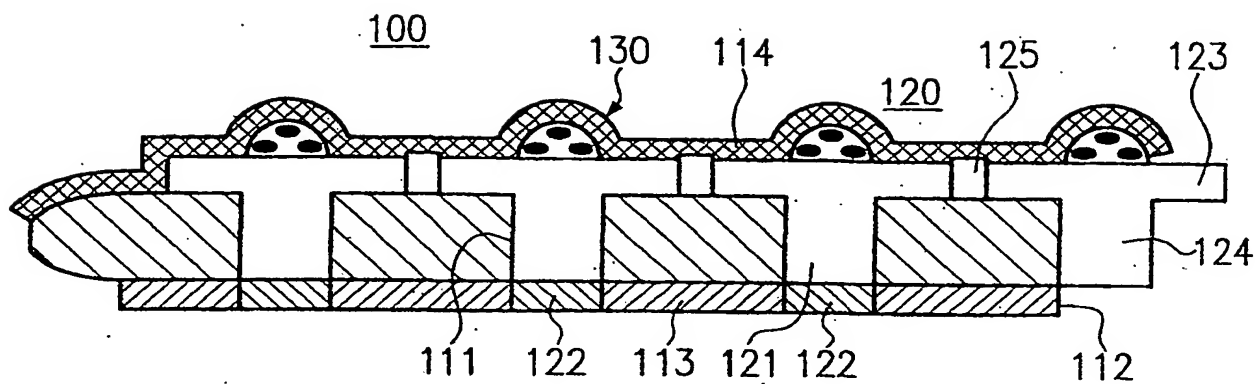


FIG.1

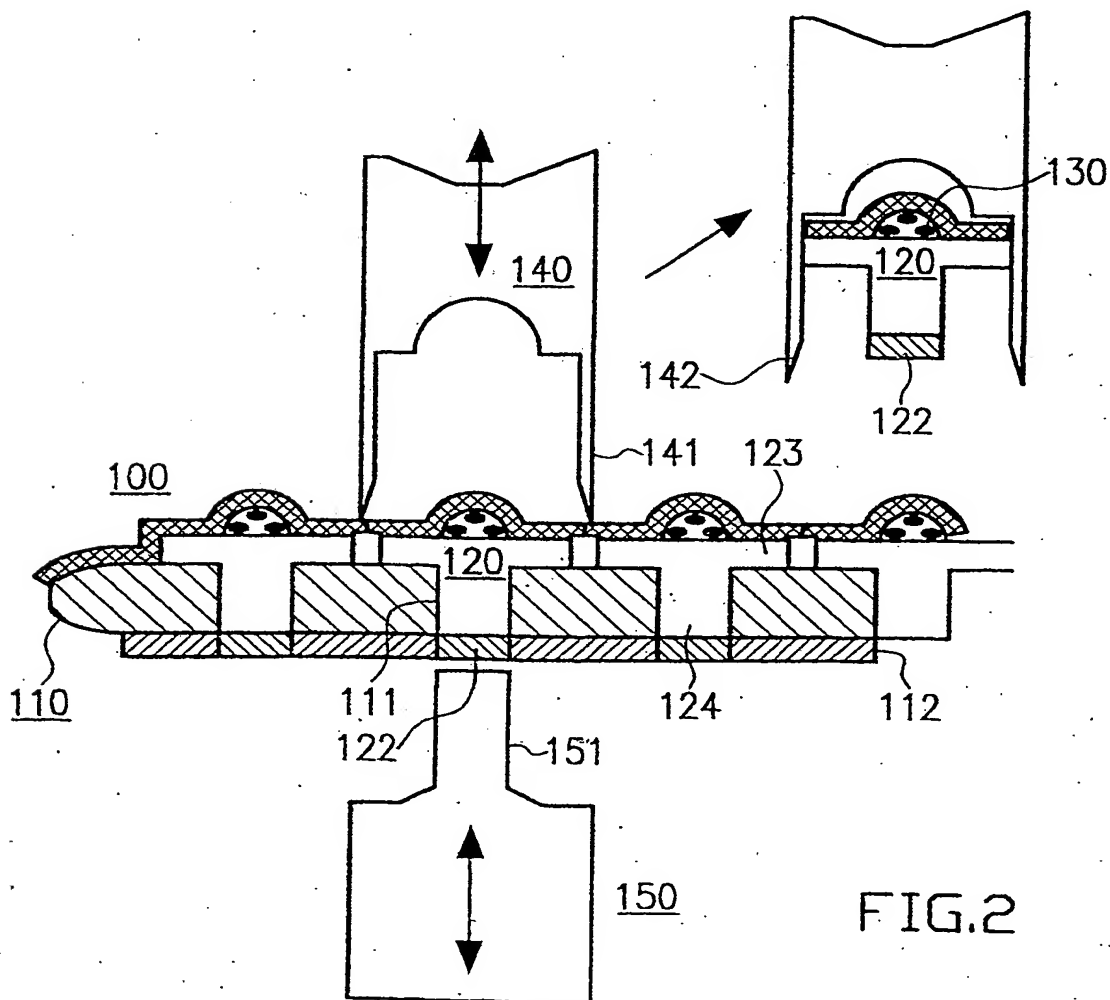
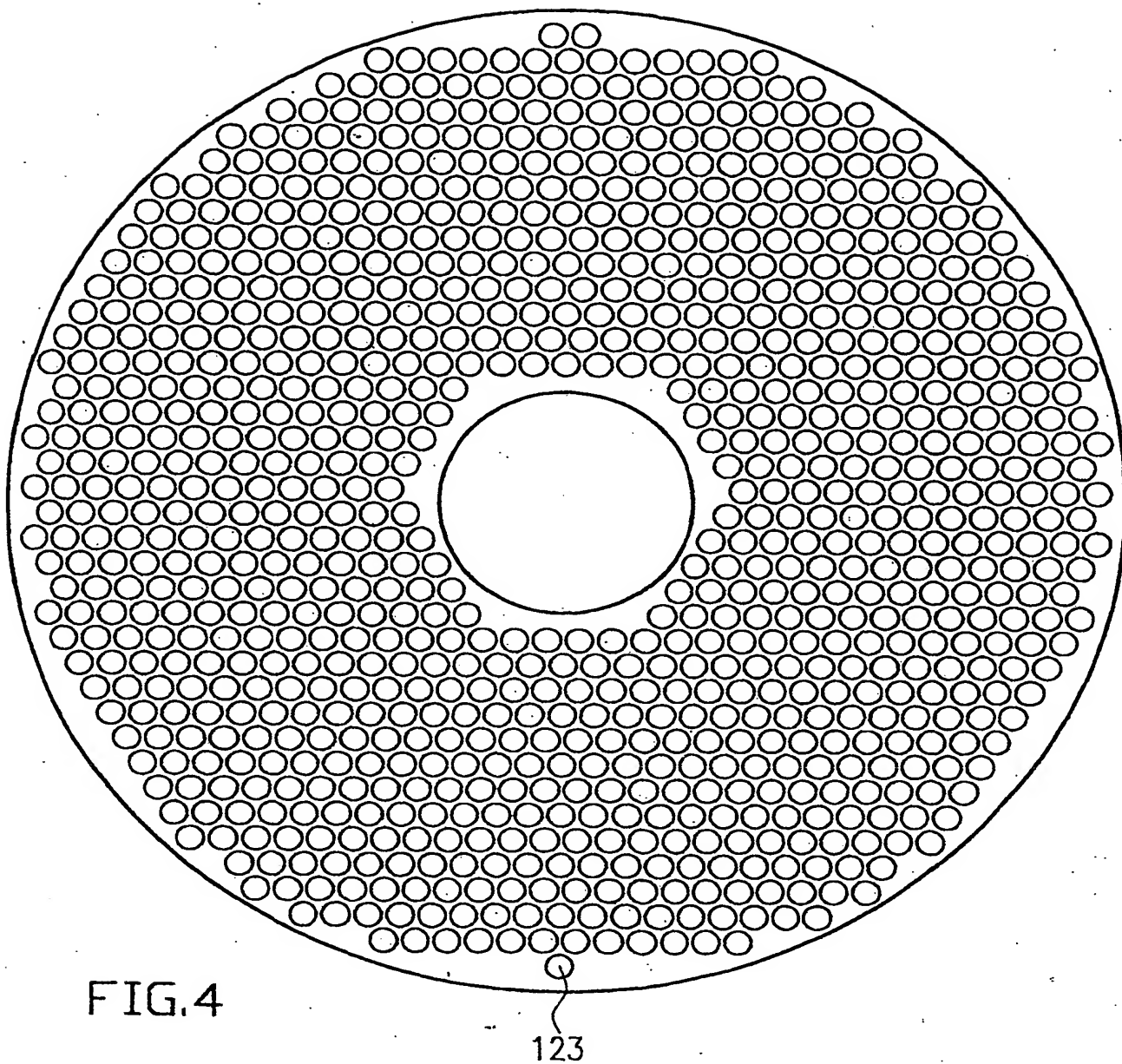


FIG.2



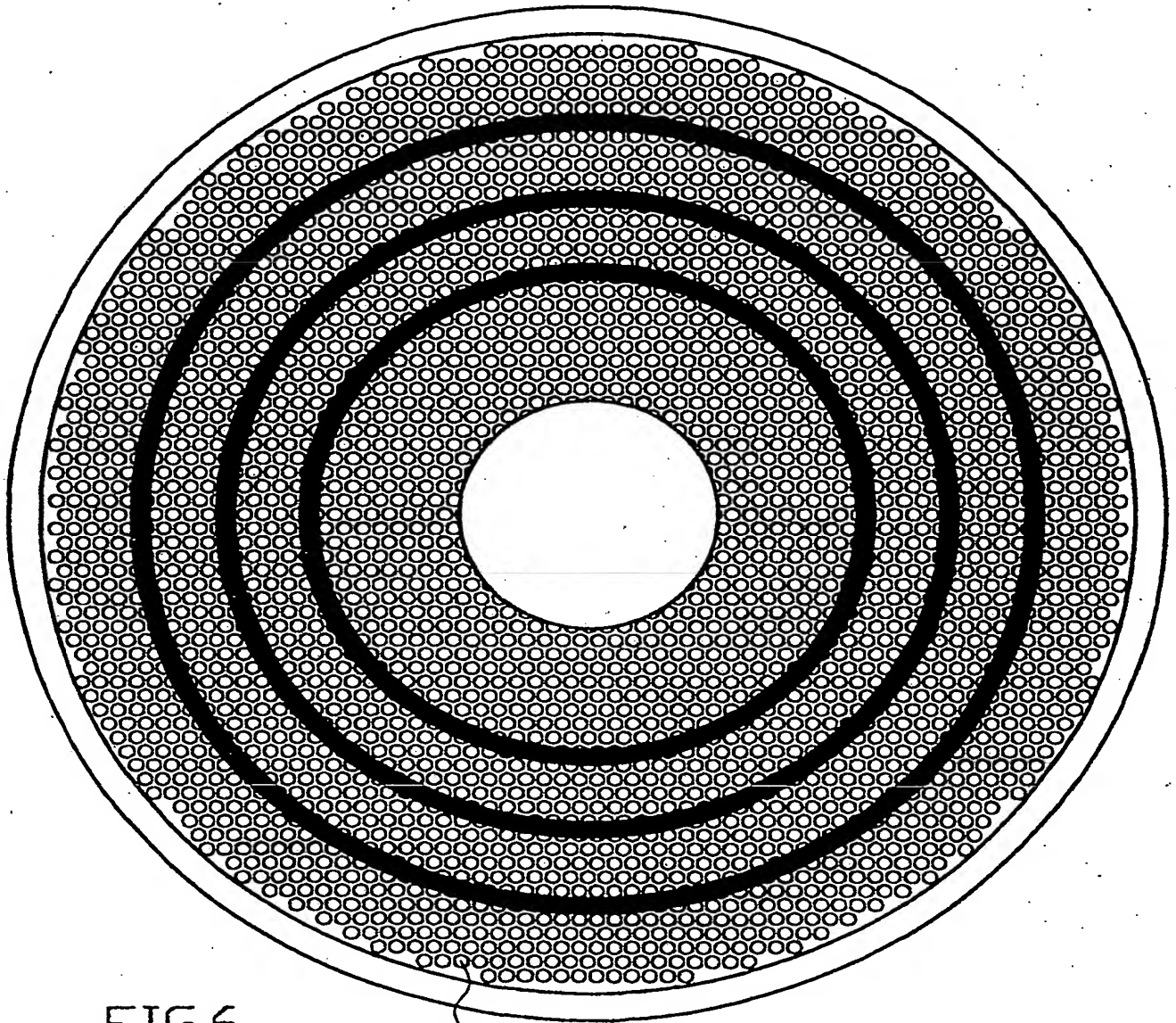


FIG. 6

123

7/17

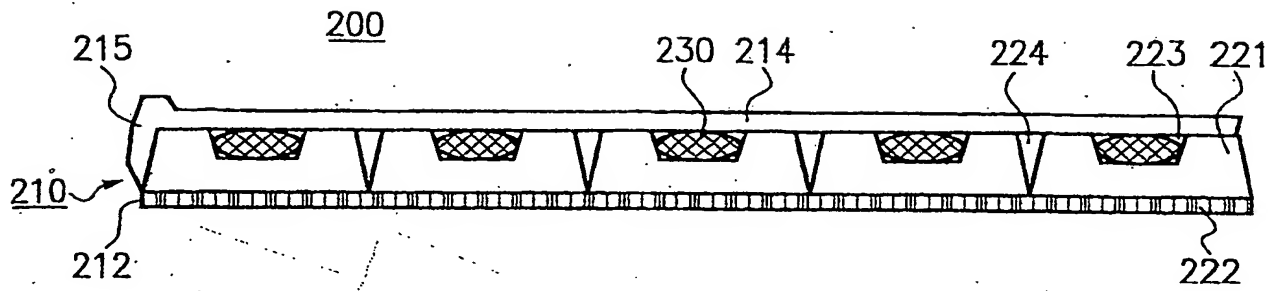


FIG. 8

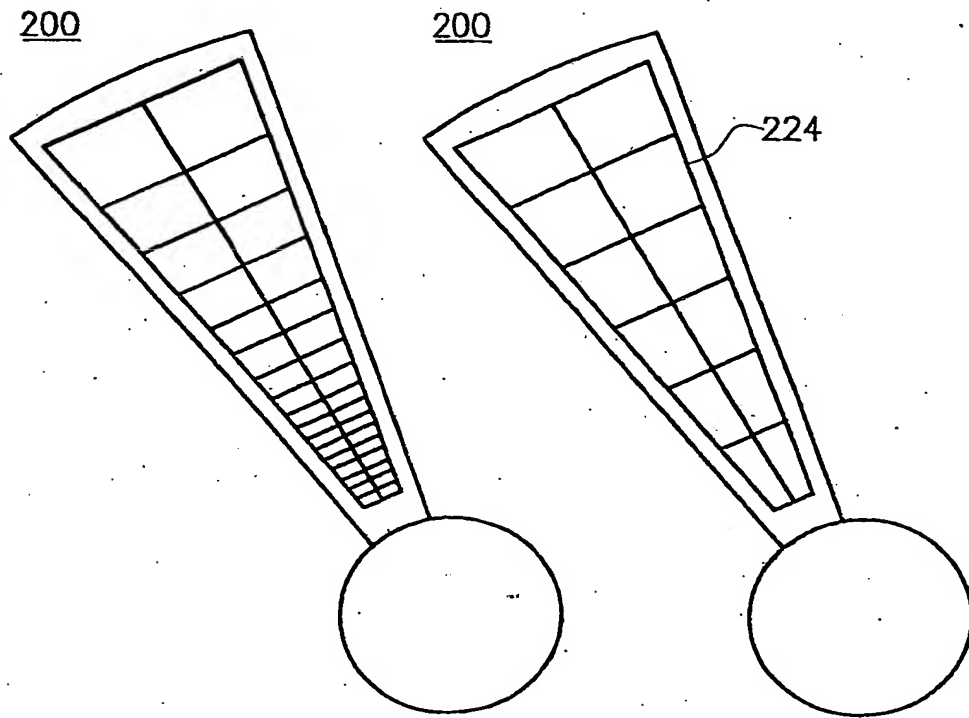


FIG. 9

9/17

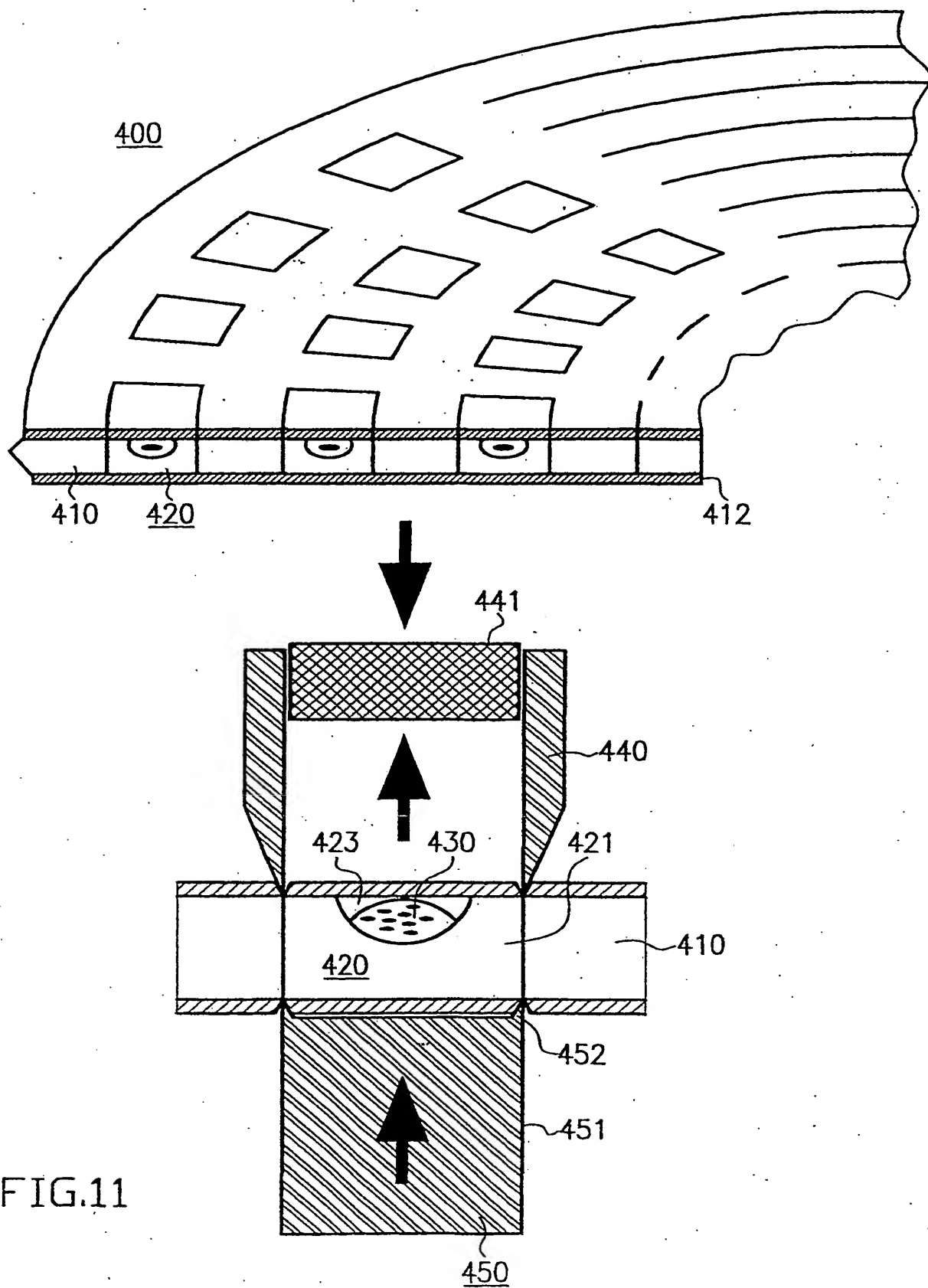


FIG.11

11/17

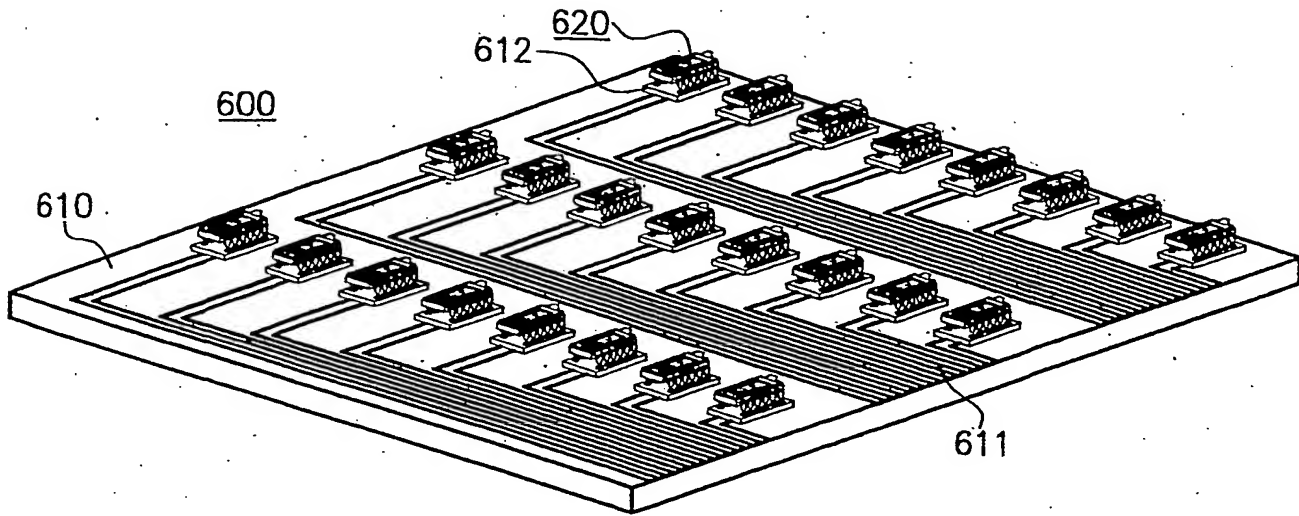
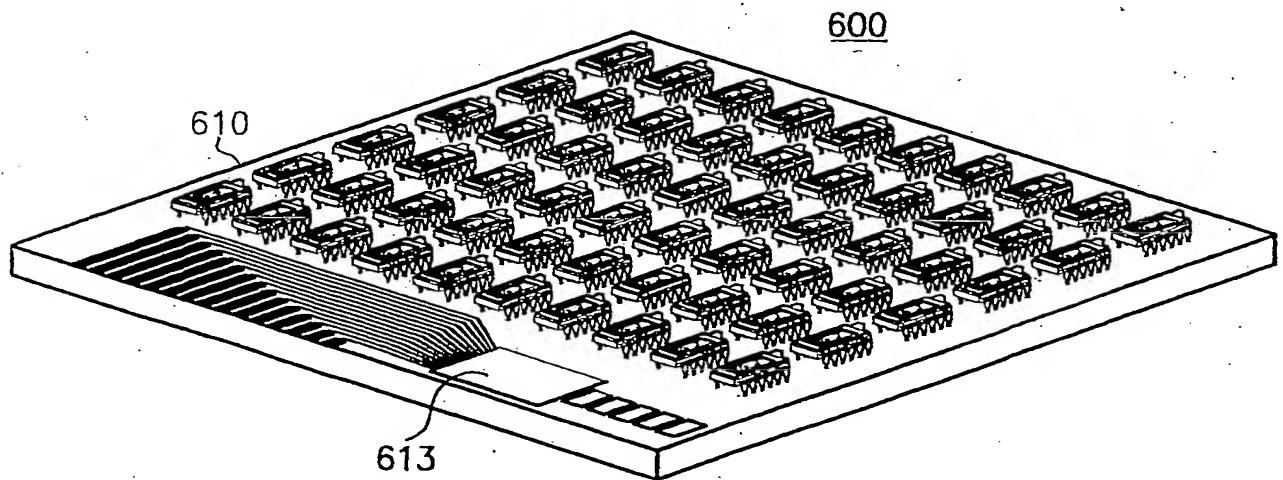
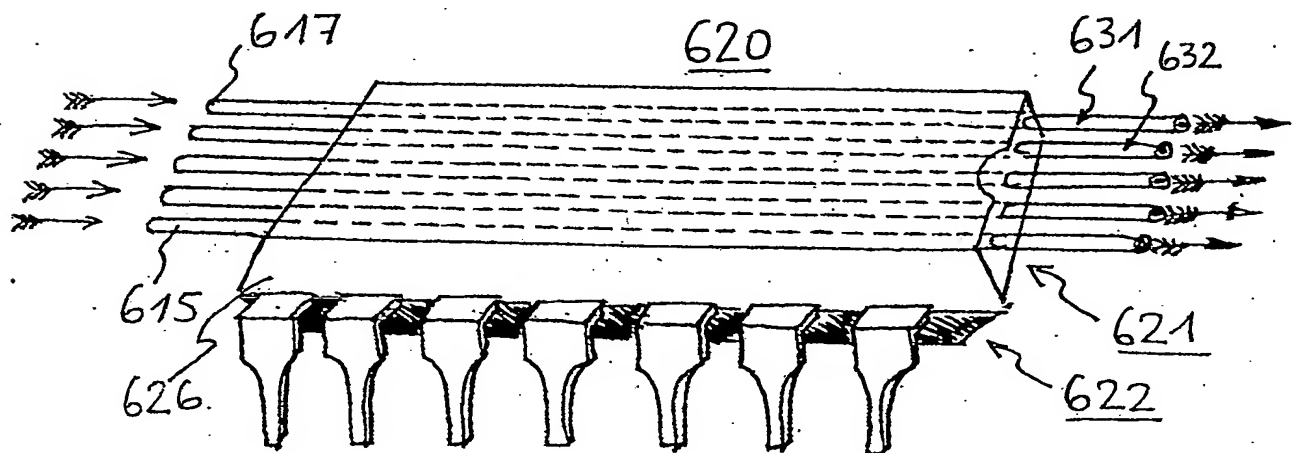
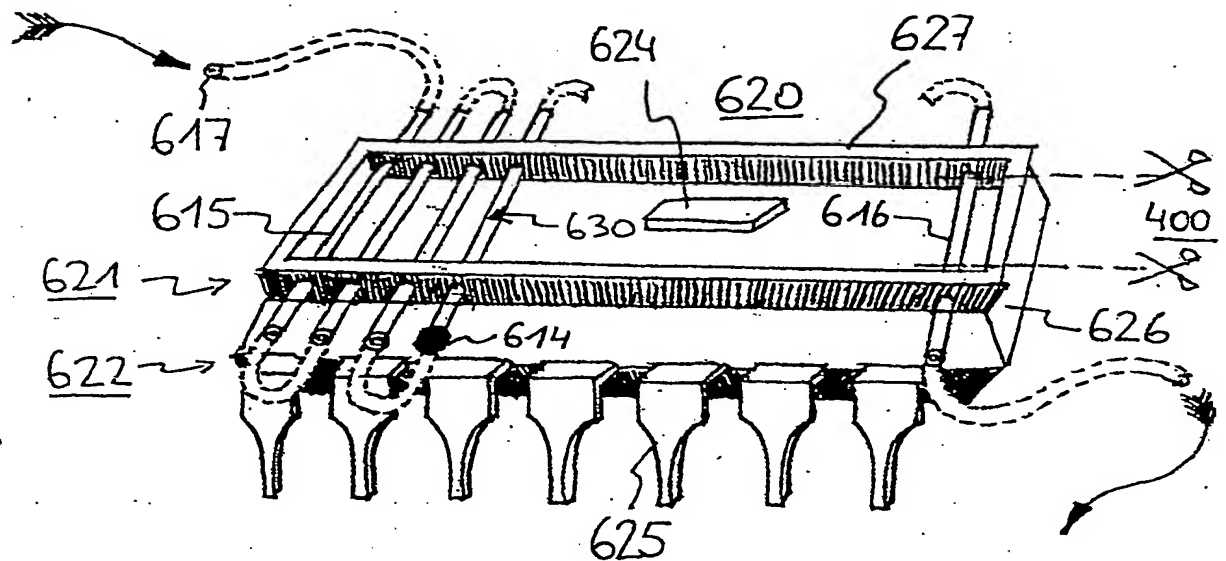


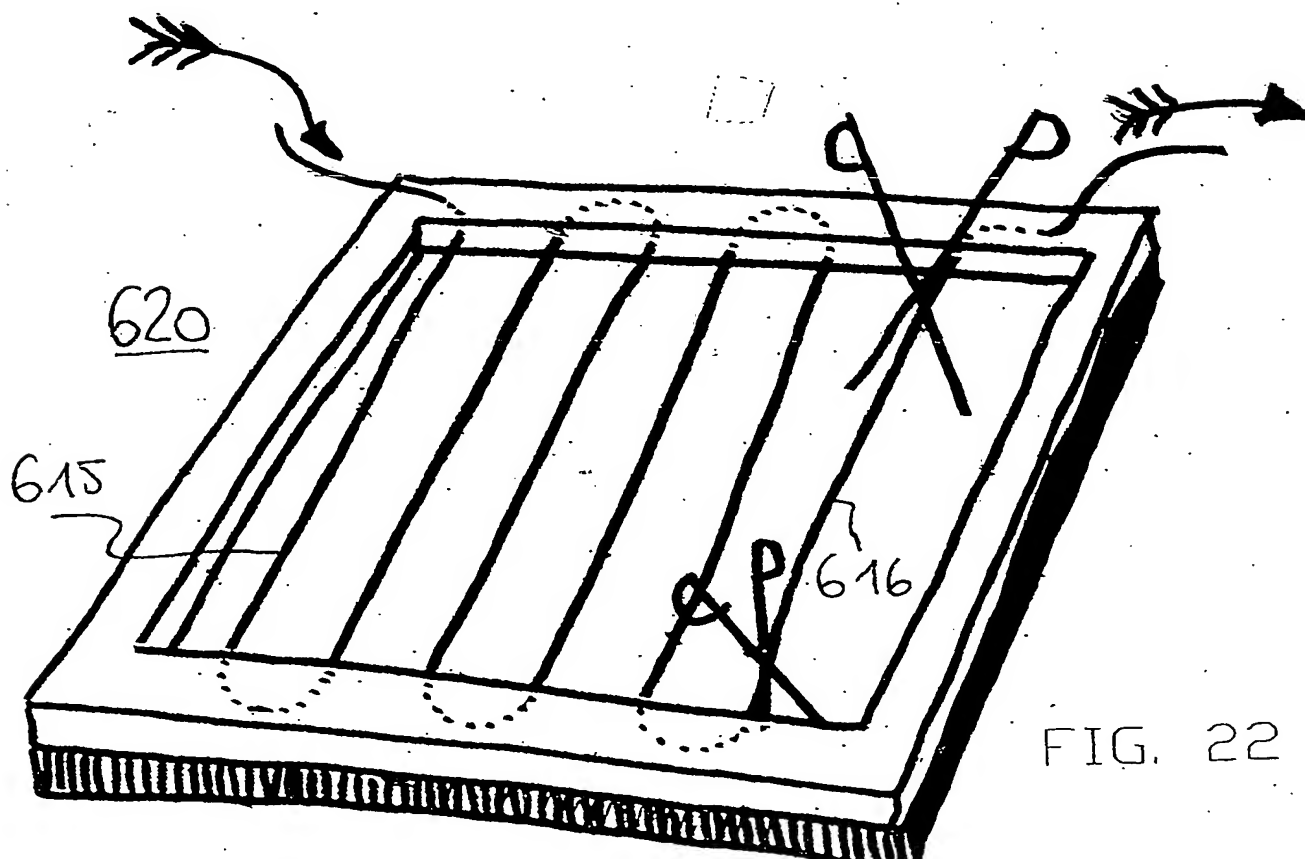
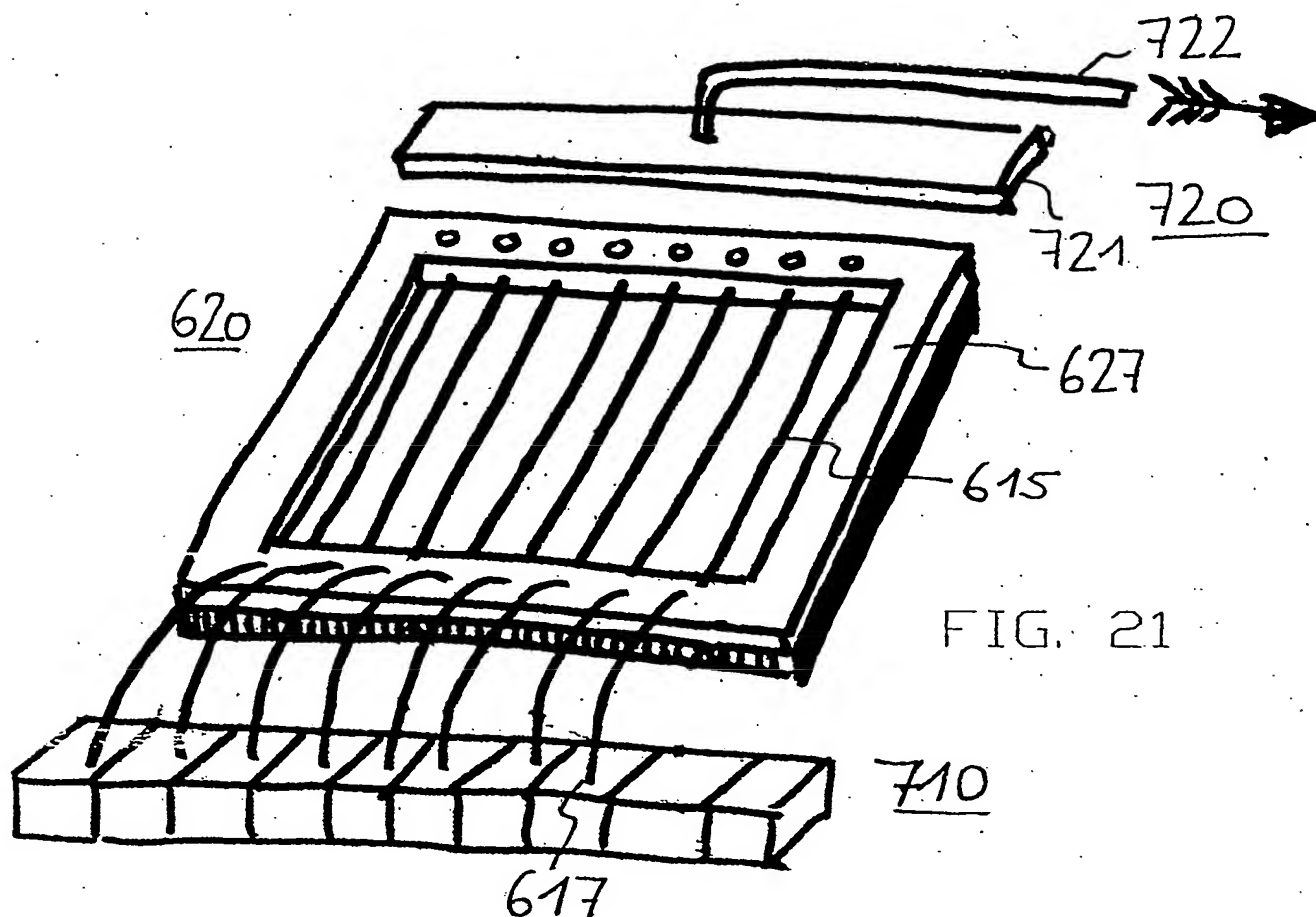
FIG.14



13/17



15/17



17/17

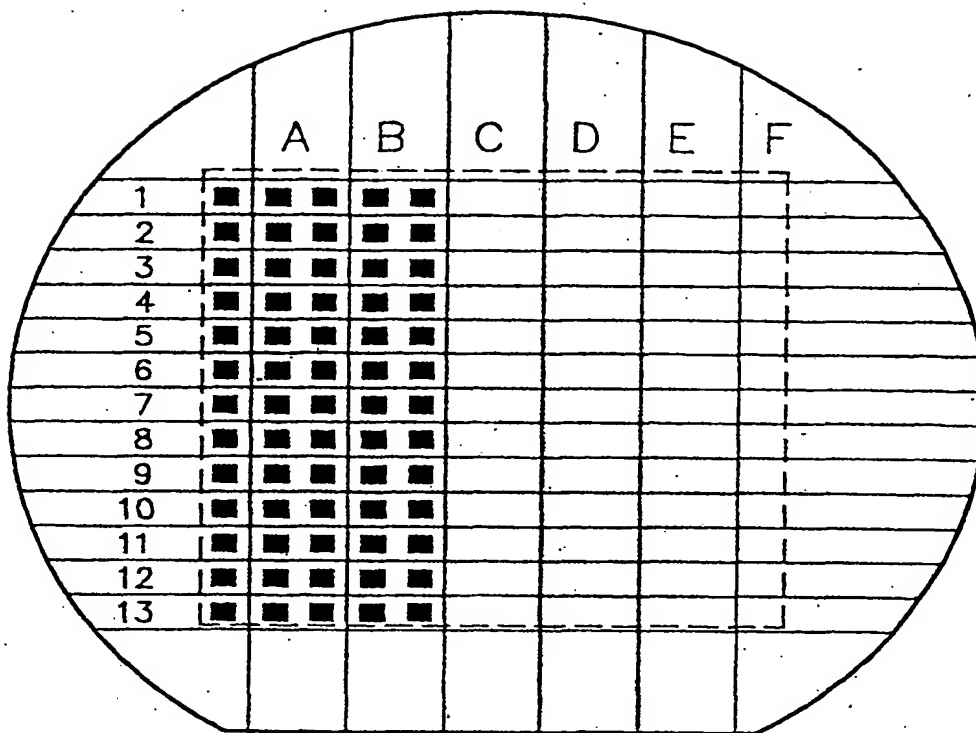


FIG. 27
Stand der Technik

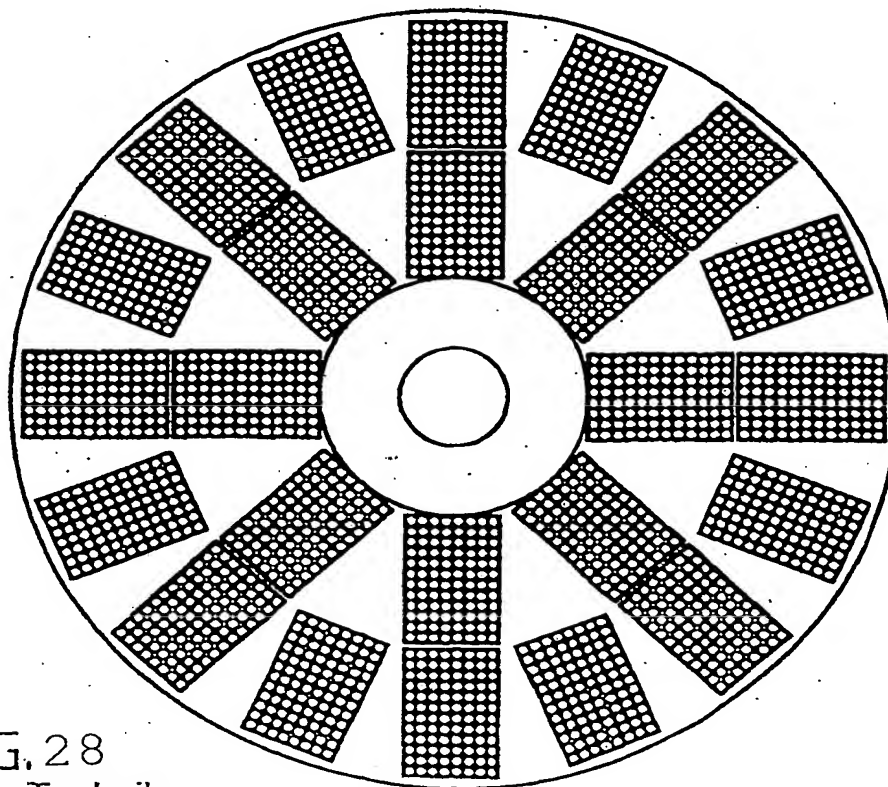


FIG. 28
Stand der Technik

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.